トマト黄化葉巻病診断キット

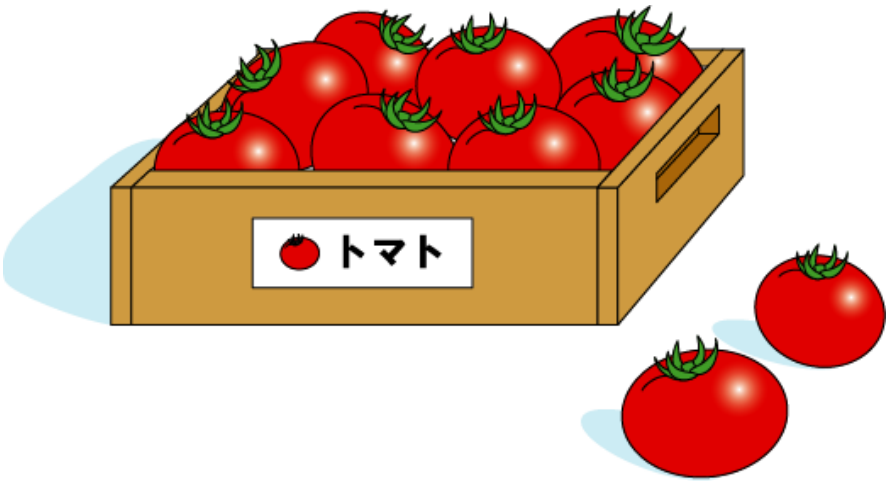
TYLCV Detection Kit

取扱説明書

version 7.0.0

製品コード

NE0011



ニッポン・ジーン

トマト黄化葉巻病診断キット
取扱説明書 version 7.0.0

【はじめにお読みください】

　このたびは、**トマト黄化葉巻病診断キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いてトマト黄化葉巻ウイルスを検出するための試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】（2 ページ）に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

3. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

4. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. トマト黄化葉巻ウイルスの感染部位、感染レベル、およびウイルス濃度によっては本キットを使用してもウイルスが検出されない場合がありますので、定期的に検査を実施してください。また、本キットは補助的に用いる簡易診断キットであるため、確定診断を保証することはできません。

6. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび **TYLCV 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

7. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
株式会社ニッポンジーン； http://nippongene-analysis.com/

8. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

9. ＬＡＭＰ法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、ＬＡＭＰ法を用いたトマト黄化葉巻病検査用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

10. **トマト黄化葉巻病診断キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
株式会社富士通システムズ・イースト
e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）； http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

1. キット説明……1

トマト黄化葉巻病診断キットの概要
トマト黄化葉巻病とその診断
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して

2. キット内容……2

キット内容と保存温度

3. 必要な器具、機器……3

4. キット使用方法……5

簡易プロトコル……5
検査を行う前の準備および注意事項……7
　サンプルの準備
　葉の突き方
　器具、機器の準備
　検査環境
詳細な使用方法……11
　検査反応
　判定

5. トラブルシューティング……16

6. 文献・資料……17

7. 付録……18

品質管理
系統
他のサンプル調製方法
メモ

1. キット説明

【トマト黄化葉巻病診断キットの概要】

本キットはLAMP法を利用してトマト黄化葉巻病の病原体であるトマト黄化葉巻ウイルス（TYLCV; *Tomato yellow leaf curl virus*）を検出するキットです。LAMP法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便なDNA増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP法によりトマト黄化葉巻ウイルスゲノムDNAの一部を増幅し、増幅の有無からトマト黄化葉巻ウイルスの存在を判定します。

検出に必要な操作は、トマト黄化葉巻ウイルスの保持が疑われるトマト葉およびその他の植物体、媒介虫であるタバココナジラミ等のサンプルを爪楊枝で突き、この爪楊枝を検査溶液（**TYLCV検査液**、**TYLCV酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に加えて60-65℃に60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。検体中にトマト黄化葉巻ウイルスが存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってトマト黄化葉巻ウイルスゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、検体中にトマト黄化葉巻ウイルスが存在しない場合には、DNAの増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でトマト黄化葉巻ウイルスを検出することが可能です。

【トマト黄化葉巻ウイルスとその診断】

トマト黄化葉巻病は 1990 年代半ばに日本国内に侵入したトマト黄化葉巻ウイルスの感染により引き起こされるウイルス病です。トマト黄化葉巻ウイルスはジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に分類され、環状一本鎖 DNA をゲノム DNA として有しています。トマト黄化葉巻ウイルスが感染したトマトは葉の黄化や萎縮による生育不良を起こし、その結果、トマトの収穫量が減少します。現在、様々なウイルス防除対策が講じられておりますが、ウイルスを媒介するタバココナジラミが非常に微少な害虫であり、発見、駆除が困難であることから、ウイルスの拡大を完全に防ぐことは困難な状況となっています。また、2009 年現在、媒介虫の在来系統であるタバココナジラミバイオタイプ B（タバココナジラミ）とは薬剤への抵抗性が異なる、タバココナジラミバイオタイプ Q の分布が拡大しており、ウイルス防除対策をさらに困難にしています。

その中で、ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法や PCR（Polymerase Chain Reaction）法を用いたトマト黄化葉巻ウイルス検出技術が開発されましたが、ELISA 法およびそれに準ずるイムノクロマトグラフィー法は抗血清や抗体を必要とする上に、検出感度が低く偽陽性、偽陰性に問題を残しています。現在では、PCR 法による DNA 増幅反応がウイルス検出に妥当な手段とされていますが、PCR 法は最低でも 2 段階の温度変化の繰り返しを必要とする上、判定には電気泳動による DNA の分離操作が不可欠であり、診断分野への応用においてその繁雑な操作に問題を残していました。

【LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアル ホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル; http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

トマト黄化葉巻病診断キット

50 テスト用（製品コード: NE0011）

試薬名 （チューブラベル）	頭部ラベル色	内容量 50 テスト用	保存温度
取扱説明書	−	1 部	室温
検査用チューブ	−	50 本	室温
TYLCV 検査液	赤色	230.0 µl	−20°C（遮光）
TYLCV 酵素液	緑色	15.0 µl	−20°C（遮光）
蛍光発色液	紫色	15.0 µl	−20°C（遮光）
TYLCV 陽性コントロール	灰色	25.0 µl	−20°C（遮光）
ミネラルオイル	青色	1,000.0 µl	−20°C（遮光）

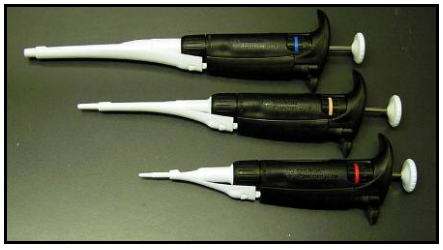
取り扱い上の注意

- 本キットでは、50 テスト分の検査溶液を作製することにより、50 テスト分の検査反応を行うことが可能です。50 テスト以下の検査反応を複数回行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。
- **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。
- **取扱説明書**および**検査用チューブ**以外の試薬は−20°Cで遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。
- 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20°Cで保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。
- **TYLCV 酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。
- **TYLCV 陽性コントロール**は、トマト黄化葉巻ウイルスゲノムDNAに特徴的な配列が含まれています。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。
- 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。
- **ミネラルオイル**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ずMSDSを参照の上、使用してください。

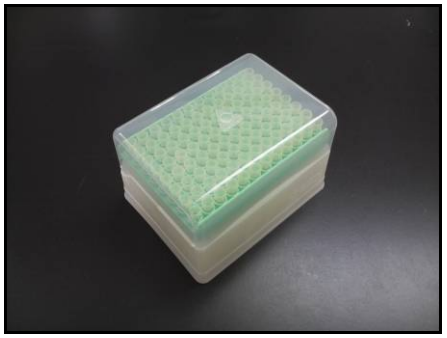
3. 必要な器具、機器

【必ずご準備頂く器具、機器】

- マイクロピペット
  (0.5–10 µl、10–100 µl、200–1,000 µl)



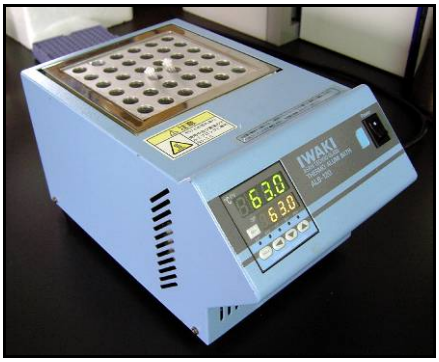
- フィルター付マイクロチップ（滅菌済)*



- マイクロチューブ
  (1.5 ml あるいは 2.0 ml)

- 使い捨て手袋

- インキュベーター（恒温器）
  ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、60–65°C それぞれを保持する機器が必要です。

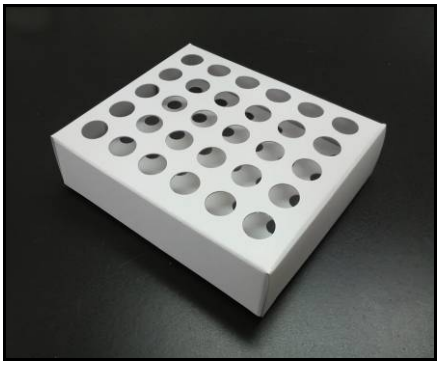


- 木製の爪楊枝

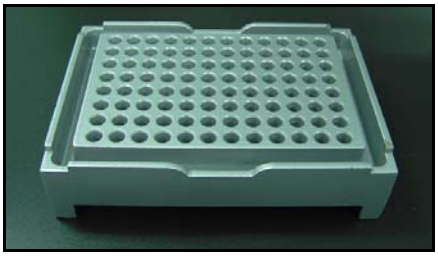
【その他の器具、機器】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- チューブラック*



- アルミラックあるいはプレートラック



● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）

● フロートプレート*
ウォーターバスで保温する際に使用します。

● UV 照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。
240–260 nm あるいは 350–370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

● ピンセット

● 氷（クラッシュアイス）

● サンプル採取用ビニールパック

● 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

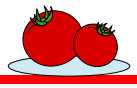
● 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液

＊マイクロピペット、ピペットチップ、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子ツールボックス**（製品コード： NE4111）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

4. キット使用方法

【簡易プロトコル】

本キットの詳細な使用方法は 7 ページ以降を参照してください。



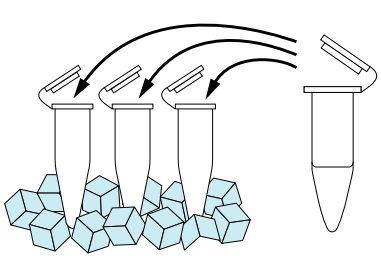
簡易プロトコル

1. 検査溶液を必要量まとめて作製する

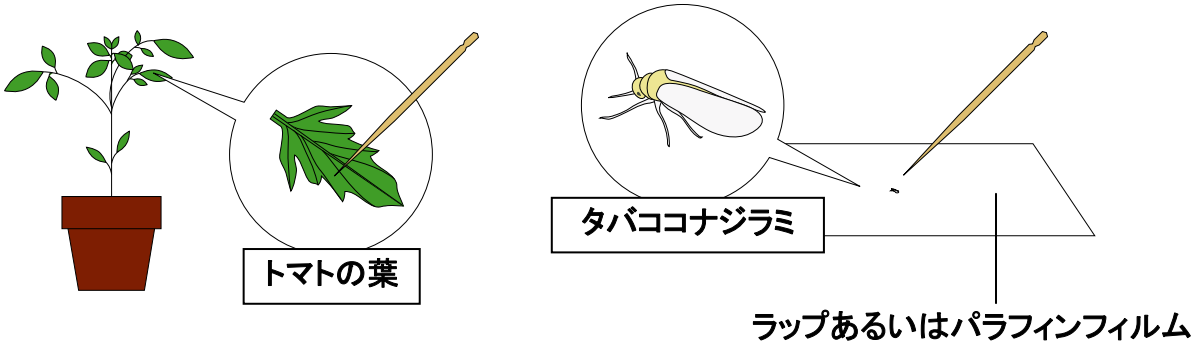
試薬	1 テストあたり	25+1 テスト*	50+1 テスト*
TYLCV 検査液	4.6 µl	119.6 µl	234.6 µl
蛍光発色液	0.2 µl	5.2 µl	10.2 µl
TYLCV 酵素液	0.2 µl	5.2 µl	10.2 µl
検査溶液合計	5.0 µl	130.0 µl	255.0 µl

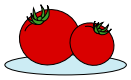
＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

2. 検査溶液を 1 テストあたり 5.0 µl ずつ分注する

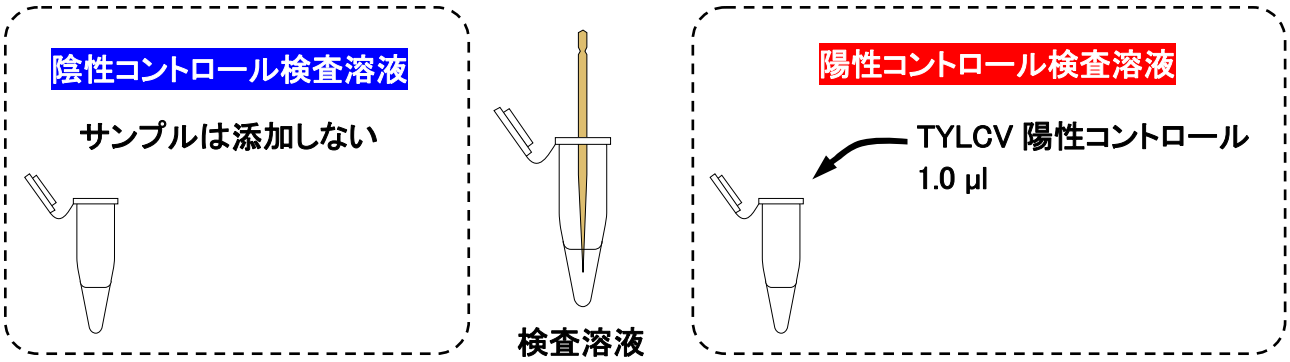


3. サンプルを爪楊枝で突く

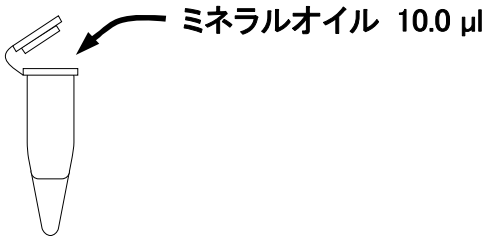




4. 前工程の爪楊枝を検査溶液に浸す



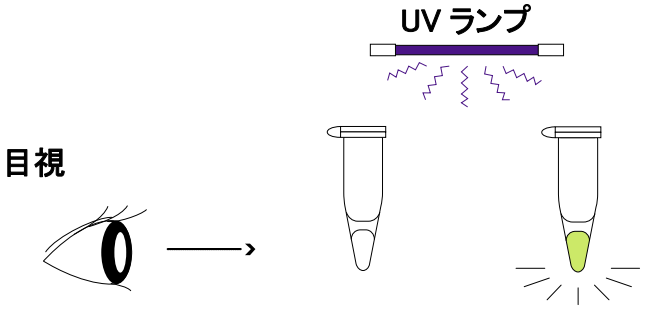
5. ミネラルオイルを入れる

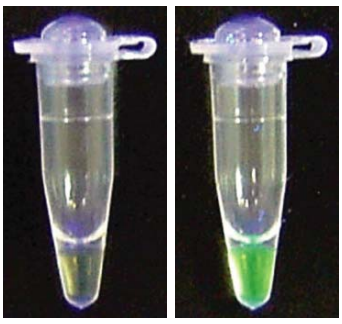


6. 63˚C、60 分間

7. 80˚C、2 分間

8. 判定





【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■　コントロール

本キットには、検査の成否を確認するための TYLCV **陽性コントロール**が添付されています。検査の成否を確認するには、TYLCV **陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」および未使用の TYLCV **陽性コントロール**を添加しない「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

■　サンプル準備

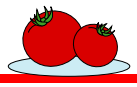
圃場において診断を実施する場合、トマト黄化葉巻ウイルスの保持が疑われるトマトその他の植物体の一部（トマトの場合、頂芽あるいは頂芽から2枚目の葉）を爪楊枝で突き、爪楊枝を清潔なビニールパック等に回収します。このとき、汚染や誤判定を防ぐため、爪楊枝同士が接触しないよう、必ず 1 本ずつ別々に保存してください。また、サンプルの採取においては必ず使い捨て手袋を着用し、もし爪楊枝の先端に手指が接触した場合は手袋を交換してください。この爪楊枝の先端にはサンプルが付着しており、直接検査に用いることが可能です。

トマトその他の植物体の一部（葉や茎等）を採取してビニールパック等に回収し、同様に爪楊枝で突いて検査をおこなうことも可能です。枯死したサンプルからの検査も可能ですが、安定な結果を得るために、新鮮なサンプルを採取してください。また、病徴が認められないトマトの葉にもトマト黄化葉巻ウイルスが潜伏している場合がありますので、葉をよく観察し、疑わしい葉から検査を行ってください。なお、無病徴のトマト黄化葉巻ウイルス抵抗性品種においても感染が認められる場合があります。

タバココナジラミをサンプルとする場合は、タバココナジラミを密封できる容器に捕獲し、適当量の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) あるいは滅菌水を検体に滴下して飛散を防止してから爪楊枝で突いて検査を行ってください。黄色粘着板に付着したタバココナジラミを爪楊枝で突いて検査をおこなうことも可能ですが、粘着液が多量に混入するとトマト黄化葉巻ウイルスの存在の有無に関わらず、検査溶液が発色することがありますので、ご注意ください。

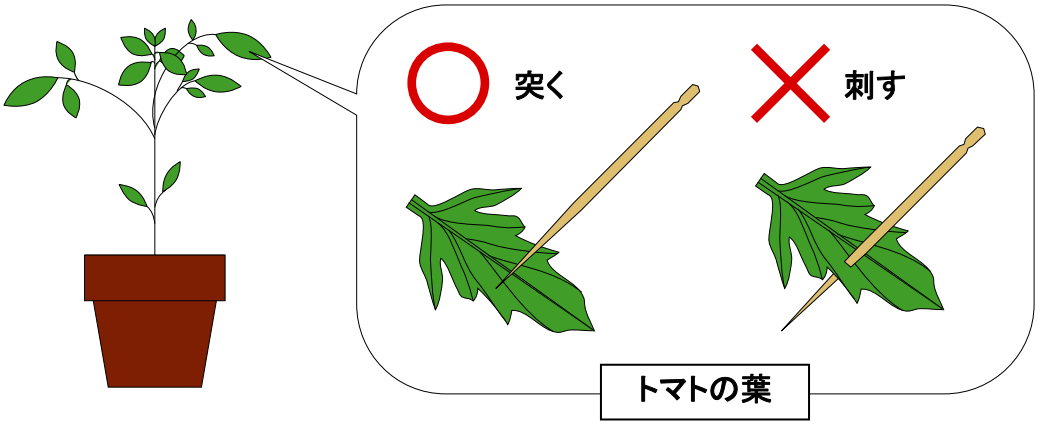
サンプルの準備においては、他の栽培環境にトマト黄化葉巻ウイルスが拡大しないよう、各施設における適切な措置を執ってください。特に、トマト施設間におけるタバココナジラミの移動が発生しないよう、作業用の着衣および器具への付着には十分注意し、防虫ネットや薬剤の使用、着衣の交換による防除を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みの爪楊枝およびビニールパック、検査後サンプル等は二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、オートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

【葉の突き方】



葉の突き方

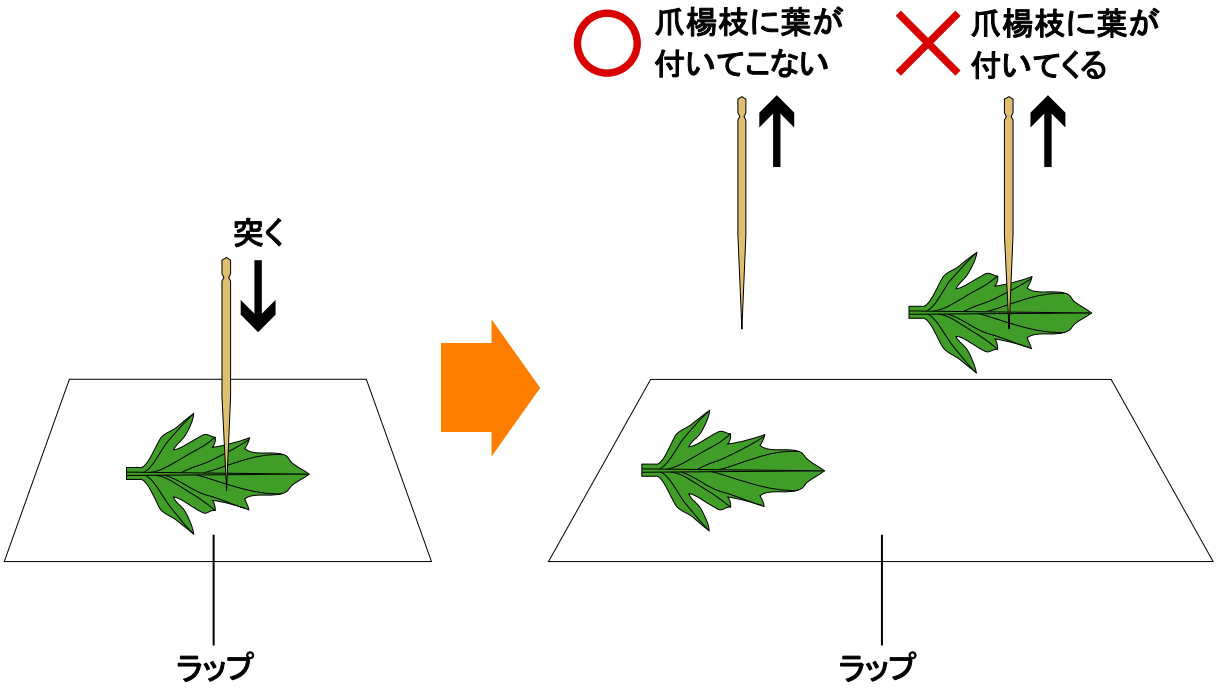
サンプル採取時に、トマトの葉を貫通させないでください。サンプルの過剰な持ち込みは、偽陽性の原因となります。



偽陽性が疑われる場合には、下記のように堅い台の上にラップを敷き、ラップの上に置いた葉を爪楊枝で軽く突いて、再度検査を行ってください。

重要

爪楊枝に葉が付いてこない程度の強さで葉を突いてください。



器具、機器の準備

■ インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

LAMP法は高感度なDNA増幅技術であるため、検査環境に **TYLCV 陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルおよび **TYLCV 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■ 作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では **TYLCV 陽性コントロール**およびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないでください。

検査溶液へのサンプルおよび **TYLCV 陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよくすすぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

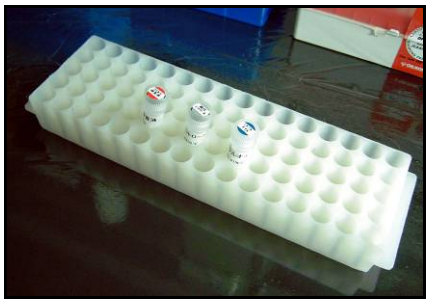
＜方法＞

i) 使い捨て手袋を装着します。
ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv) 非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
v) 作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

【詳細な使用方法】

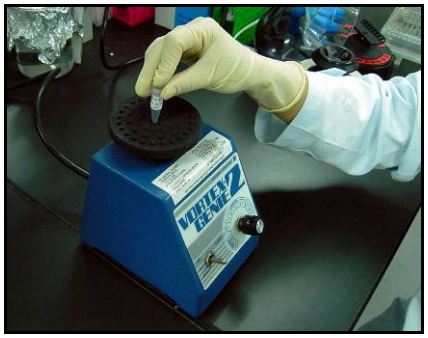
検査反応

試薬の融解



TYLCV 検査液、**TYLCV 陽性コントロール**、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。**TYLCV 酵素液**および**蛍光発色液**は−20°Cでは凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンダウン



チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製

マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

試薬	1テストあたり	25+1 テスト*	50+1 テスト*
TYLCV 検査液	4.6 µl	119.6 µl	234.6 µl
蛍光発色液	0.2 µl	5.2 µl	10.2 µl
TYLCV 酵素液	0.2 µl	5.2 µl	10.2 µl
検査溶液合計	5.0 µl	130.0 µl	255.0 µl

＊　分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

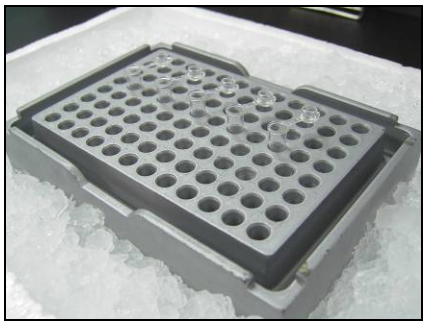
重要

検査溶液作製の際は**検査用チューブ**を使用せずに、1.5 ml のマイクロチューブ（写真右）などを別途ご用意ください。また、分注時の液量の不足を防ぐため、検査溶液は 1 テスト分多めに作製してください。

連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

TYLCV 酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また使用前にスピンダウンを行ってください。

検査溶液の分注

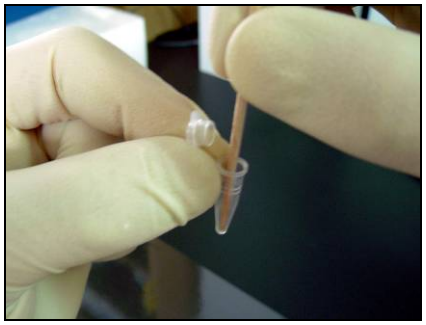


核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を 5.0 µl ずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

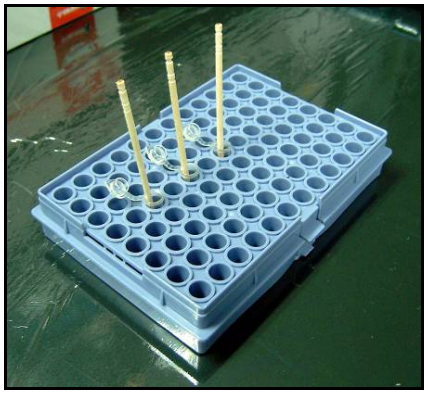
サンプルの添加



サンプルが付着した爪楊枝を検査溶液に浸して**検査用チューブ**の底に軽くこすり付けます。その後、爪楊枝は速やかに取り出し、ビニール袋にまとめて廃棄します。サンプル添加後、各チューブにミネラルオイルを 10.0 µl ずつ分注してキャップを閉じます。

コントロールを作製する場合は、

i) サンプル添加の前に陰性コントロール検査溶液のチューブに 10.0 µl の**ミネラルオイル**を分注してキャップを閉じます。
ii) 爪楊枝でサンプルを添加し、各チューブに**ミネラルオイル**を 10.0 µl ずつ分注してキャップを閉じます。
iii) 最後に、陽性コントロール検査溶液のチューブに **TYLCV 陽性コントロール**を 1.0 µl 添加し、**ミネラルオイル**を 10.0 µl 分注してキャップを閉じます。



重要

爪楊枝を浸した状態で放置すると検査溶液を吸収するため、検査溶液の液量が減少し、判定が困難になります。サンプルを添加した後は爪楊枝を検査溶液中に放置しないよう、ご注意ください。

ミネラルオイルを添加しなかった場合、蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が著しく低下します。検査の際はキット添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。

検査反応

ヒートブロック

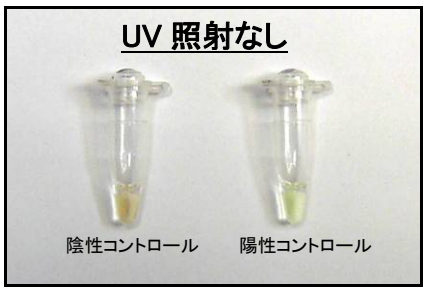
フロートプレート

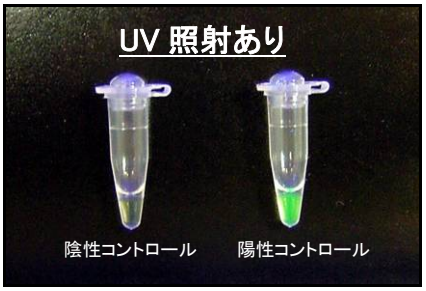
全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーターなどを用いて 63°C で 60 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、**検査用チューブ**が反応中に傾かないようにしてください。

判定

検査の成否の判定





60分間保温した後、80℃で 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240–260 nm あるいは 350–370 nm の波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は60分間が経過した時点の発色で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中にトマト黄化葉巻ウイルスが存在する可能性があります。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「**トマト黄化葉巻ウイルス陽性**」と判定します。

仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、「**トマト黄化葉巻ウイルス陽性**」と判定します。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「**トマト黄化葉巻ウイルス陰性**」と判定します。

ただし、感染初期の植物体においてはウイルス濃度が低く、蛍光の発色が認められない場合がありますので、本キットを用いた検査において「**トマト黄化葉巻ウイルス陰性**」と判定され、病徴も認められない植物体についても、感染の疑いがある場合は 10 日間以上経過してから再度検査を実施してください。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
検査溶液が緑色を呈して判定が困難である	**A. 葉サンプルの持ち込み量が過剰である。** 本キットはきわめて高感度ですので、葉を突いた爪楊枝の先端が緑色にならない程度で検査が可能です。過剰なサンプルの持ち込みは偽陽性の原因となりますので、ご注意ください。
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. TYLCV 陽性コントロールの添加量が過剰である。** **TYLCV 陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。**TYLCV 陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型 DNA となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取扱は本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付のミネラルオイルを必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240–260 nm あるいは 350–370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。

6. 文献・資料

1. Fukuta S, Kato S, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. (2003) Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J Virol Methods*. **112** (1-2), 35

2. 福田 至朗、吉田 桂子、神戸 三智雄 (2003) LAMP 法によるトマト黄化葉巻ウイルス検出技術の開発 ブレインテクノニュース **112** (1-2), 35

3. 福田 至朗、穴井 尚子、加藤 政司、吉村 幸江、深谷 雅博、矢部 和則、大矢 俊夫、神戸 三智雄 (2005) 簡易な鋳型調製による loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出 関西病虫害研究会報

4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12): e63

5. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

7. 付録

【品質管理】

キット添付の **TYLCV 陽性コントロール** 1.0 µl を検定用サンプルとする品質管理試験において、5.0 µl（1 テスト分）のスケールで DNA 増幅反応を行い、63°C、1 時間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

【系統】

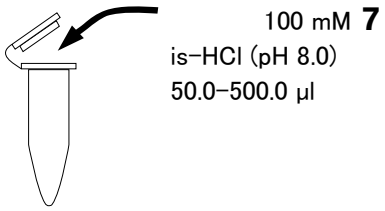
LAMP 法は 4 から 6 種類のプライマーを必要とする方法です。本キットに含まれるプライマーはトマト黄化葉巻ウイルス（TYLCV; *Tomato yellow leaf curl virus* ）のゲノム DNA の塩基配列のうち、以下の各系統によく保存された領域をもとに設計されています。

GenBank Accession No.	系統名
AB014347	TYLCV-Aichi（愛知県）
AB116633	TYLCV-Atu（愛知県）
AB014346	TYLCV-Shizuoka（静岡県）
AB110218	TYLCV-Israel Sz（静岡県）
AB116632	TYLCV-SzY（静岡県）
AB116635	TYLCV-SzD（静岡県）
AB116636	TYLCV-SzOs（静岡県）
AB116634	TYLCV-Kis（三重県）
AB110217	TYLCV-Israel Ng（長崎県）
AB116630	TYLCV-Omu（長崎県）
AB116629	TYLCV-Miy（宮崎県）
AB116631	TYLCV-Mis（熊本県）
AB192965	TYLCV-Tos（高知県）
AB192966	TYLCV-Tos (H)（高知県）
AY530931	TYLCV-Florida
NC_004005	TYLCV-Alm
AJ489258	TYLCV-Almeria
AJ223505	TYLCV-Cuba
AF024715	TYLCV-Dominican
AY594174	TYLCV-Egypt
AJ132711	TYLCV-Iran
AF105975	TYLCV-Portugal
AY134494	TYLCV-Puerto Rico
AJ865337	TYLCV-Reunion
AF071228	TYLCV-Spain7297
X61153	TYLCV-Sardinia V

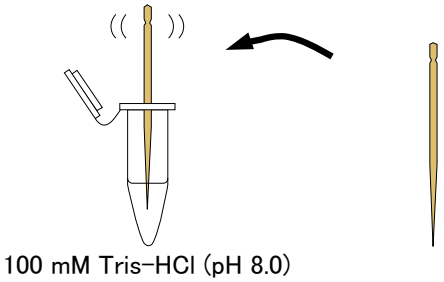
【他のサンプル作製方法】

爪楊枝懸濁法

100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を入れる

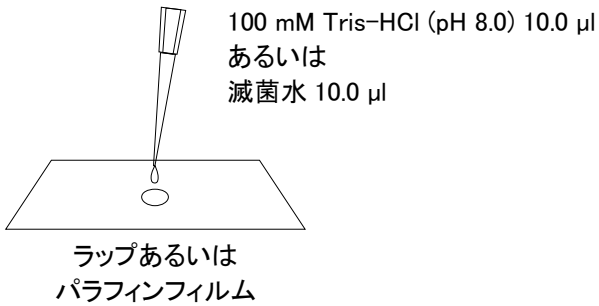


トマトの葉を突いた爪楊枝を懸濁する

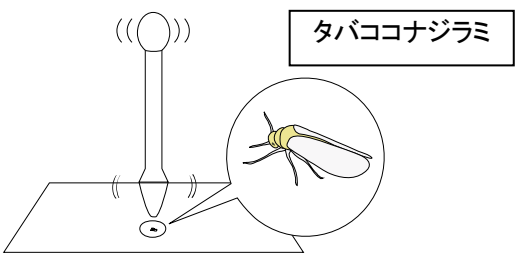


媒介虫磨砕法

100 mM Tris-HCl (pH 8.0) あるいは
滅菌水を滴下する

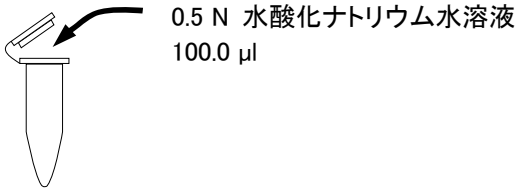


タバココナジラミを置いて磨砕用ペッスルで潰す

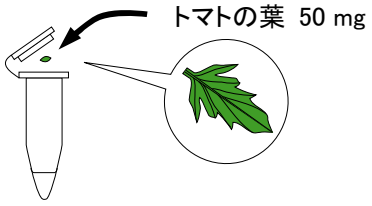


アルカリ磨砕法

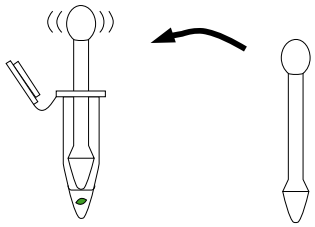
0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液を入れる



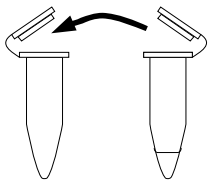
トマトの葉を入れる



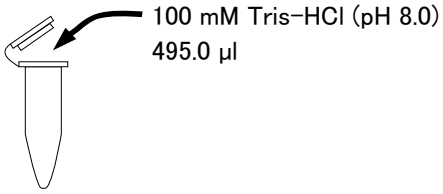
磨砕用ペッスルで擦り潰す



新しいチューブへ磨砕液 5.0 µl を移す

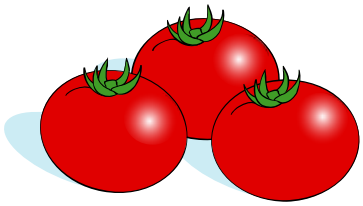


100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を入れて中和する



【メモ】

ニッポン・ジーン



- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2015 年 5 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-6712-3885
FAX	03-6712-3886
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp

Copyright © 2015 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.